质体系统发育基因组解析旋花科系统发育关系

陈丽琼[1,2]， 张志荣[3]， 杨俊波[3]， 李德铢[3]， 郁文彬[1,4,5*]

（1. 中国科学院西双版纳热带植物园 综合保护中心，云南 勐腊 666303；2. 中国科学院大学，北京 100049；3. 中国科学院昆明植物研究所 中国西南野生生物种质资源库，昆明 650201; 4. 中国科学院核心植物园保护生物学协同中心，云南 勐腊 666303；5. 中国科学院东南亚生物多样性研究中心，云南 勐腊 666303）

摘要：旋花科是一个世界广布的热带类群，具有丰富的形态特征和重要的经济价值。然而，目前该科主要分支或族间的系统发育关系一直未解决。为解析旋花科内系统发育关系，该研究代表性取样旋花科内 8 个族 40 个物种，基于质体全基因组数据，使用最大似然法和贝叶斯推论进行系统发育分析。结果表明：（1）旋花科质体基因组均为四分体结构，基因组大小为 113 273~164 112 bp，蛋白质编码基因数目为 66~79 个。（2）基于五种 DNA 矩阵（即 WCG、CDS、LSC、IR、SSC）的系统发育分析结果显示，WCG 和 CDS 矩阵的拓扑结构基本一致，仅少数分支的支持率略有差异；LSC 区和 WCG 矩阵的拓扑结构差异在于菟丝子族、马蹄金族和盐帚花族的系统位置；AU 和 SH 检验表明 WCG 矩阵和 SSC 与 IR 区矩阵的拓扑结构有显著冲突。（3）所有系统发育分析结果均显示，菟丝子属和马蹄金族都包括在旋花亚科内，应处理为族等级。（4）基于 WCG 和 CDS 矩阵较好地解决了旋花科 8 个族之间的系统发育关系，即心被藤族和丁公藤族聚为一支，最先从旋花亚科分化出来，随后是菟丝子族，剩下的五个族分成两个分支。（5）系统发育基因组分析证实鱼黄草族是一个多系类群，特别是鱼黄草属，因此需重新修订该族的分类地位和鱼黄草属的划分。

关键词：旋花科，系统发育关系，质体基因组，菟丝子属，鱼黄草族

中图分类号：Q949　　　　**文献标识码：**A

收稿日期：2021-03-27

基金项目：中国科学院重大科技基础设施开放研究项目（2017-LSF-GBOWS-02）；云南省万人计划“青年拔尖人才”。[Supported by the Large-scale Scientific Facilities of the Chinese Academy of Sciences (2017-LSF-GBOWS-02); Ten Thousand Talents Program of Yunnan for Top-notch Young Talents.]

作者简介：陈丽琼(1996 -)，硕士研究生，研究方向为保护生物学，（E-mail）chenliqiong@xtbg.ac.cn。

***通信作者：**郁文彬，博士，研究员，研究方向为植物系统与演化，（E-mail）yuwenbin@xtbg.ac.cn。

Plastid phylogenomic insights into the phylogeny of Convolvulaceae

CHEN Liqiong[1,2], ZHANG Zhirong[3], YANG Junbo[3], LI Dezhu[3], YU Wenbin[1,4,5*]

(1. *Center for Integrative Conservation*, *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Mengla 666303, Yunnan, China; 2. *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China; 3. *The Germplasm Bank of Wild Species*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China; 4. *Center of Conservation Biology*, *Core Botanical Gardens*, *Chinese Academy of Sciences*, Mengla 666303, Yunnan, China; 5. *Southeast Asia Biodiversity Research Institute*, *Chinese Academy of Science*, Mengla 666303, Yunnan, China)

Abstract: The Convolvulaceae is a pantropical family with high morphological diversity and economic values. To date, however, the phylogenetic relationships among the major lineages or tribes in the family have not been fully resolved. In order to resolve these relationships, we sampled the complete plastome sequences from 40 species, representing eight recognized tribes of Convolvulaceae, and reconstructed phylogenetic trees by using both Maximum Likelihood and Bayesian Inference approaches. As the main results, we found that: (1) Convolvulaceae plastomes have the typical quadripartite structure, with the genome size ranging from 113 273 bp to 164 112 bp and including 66-79 protein-coding genes. (2) Phylogenomic analyses using five datasets (i.e., WCG, CDS, LSC, IR, and SSC matrixes) show that the topologies of the WCG and CDS trees are identical, with differences in support values for some nodes. Topological differences were found between LSC and WCG topologies, especially for the positions of Cuscuteae, Dichondreae, and Cresseae. The AU and SH tests show that topological conflicts are significant between the WCG tree and the SSC and IR trees. (3) All phylogenetic analyses confirm that *Cuscuta* and Dichondreae are nested in Convolvuloideae and should be treated as tribes. (4) Phylogenetic relationships among the eight tribes are well resolved using the WCG and CDS datasets: Cardiochlamyeae and Erycibeae form a clade as the first divergent group of Convolvuloideae, followed by Cuscuteae, with the remaining five tribes forming two major clades. (5) The phylogenomic analyses confirm that Merremieae, and in particular the genus *Merremia*, are polyphyletic, and that the circumscription and taxonomy of both Merremieae and *Merremia* need revision.

Key Words: Convolvulaceae, phylogenetic relationships, plastome, *Cuscuta*, Merremieae

旋花科（Convolvulaceae）隶属于茄目（Solanales），包含 56 个属，约 1 900 种，广泛分布于世界热带至温带地区，集中于美洲和亚洲，部分属为热带地区所特有（Brummit & Staples, 2007）。旋花科中有一些物种是重要的食用（如番薯 *Ipomoea batatas*）、药用和园林观赏的资源植物，也有一些在维持生物群落多样性扮演了重要的角色（Brummit & Staples, 2007; Costea & Stefanović, 2009）。

旋花科作为一个重要类群，其分类关系较早引起学者们的关注，Choisy 在 1834 年就发

表第一个分类系统，随后依据形态分类学方法建立至少 16 个旋花科的分类系统（Austin, 1973）。由于不同学者对分类性状的权重不一，导致分类系统中关于旋花科的范畴和等级划分都存在诸多差异。目前广泛使用的范畴分为狭义和广义。狭义的旋花科植物常为一年生或多年生藤本，茎叶常有乳汁，具双韧维管束，叶互生，螺旋排列，花整齐，两性，花冠合瓣，花冠外常有 5 条明显的瓣中带，子房不分裂，花柱 1 或 2，顶生（Stefanović et al., 2002; Brummit & Staples, 2007; 李攀, 2020）。由于独特的生境和生活习性致使属间部分形态性状发生变异，这为旋花科范围界定和科内等级划定带来一定难度，主要分歧集中在是否纳入苳鹃木属（*Humbertia*）、菟丝子属（*Cuscuta*）和马蹄金族（Dichondreae）。虽然分类学者意识到这三个类群与旋花科的密切联系，但因不共享上述狭义旋花科的部分性状，一些学者常将它们各自处理为独立的科（Austin, 1973; Baillon, 1891; Pichon, 1947）。譬如，菟丝子属寄生草本，有吸器，无根，鳞片状叶片，茎缠绕且不为绿色等性状与狭义旋花科差异较大（李攀, 2020），Roberty（1952）基于总状花序和稍肉质的蒴果将其处理为菟丝子科，这与 Austin（1973）依据染色体数目划分结果一致。马蹄金族则是因其子房深 2 裂或 4 裂，花柱基生而被独立划分为马蹄金科（Dumortier, 1829）。然而，Austin（1998）基于 128 个性状（包括花部特征、营养器官特征、解剖结构、胚胎结构和染色体数目等）进行分支分析，发现一些性状存在明显的平行演化。因此，若是仅依赖形态性状来界定旋花科和划分科下等级的分类系统会不“自然”。

随着 DNA 测序技术快速发展，基于分子证据的系统发育分析可追溯植物的系统发育关系与演化过程，为科的划定提供可靠的证据（王伟和刘阳, 2020）。在旋花科内，目前最新的分子系统学研究主要基于细胞器和核基因片段，其结果支持广义旋花科为一个单系，并进一步将其划分成 2 亚科 12 族，即苳鹃木亚科（包含 1 族 1 属 1 种，苳鹃木族，Humbertieae）和旋花亚科（包含 11 族：心被藤族（Cardiochlamyeae）、丁公藤族（Erycibeae）、马蹄金族、盐帚花族（Cresseae）、猴蜜藤族（Maripeae）、小牵牛族（Jacquemontieae）、菟丝子族（Cuscuteae）、白衫藤族（Aniseieae）、旋花族（Convolvuleae）、鱼黄草族（Merremieae）和番薯族（Ipomoeeae））（李攀, 2020; Stefanović et al., 2002, 2003）。但是，旋花亚科内主要分支之间的关系一直没有解决，如 Stefanović et al.（2002）先利用 4 个质体基因认为心被藤族为旋花亚科的基部类群，后增加了核基因和线粒体基因数据结果显示旋花亚科主要分支形成“梳齿”结构（Stefanović & Olmstead, 2004）。Refulio-Rodriguez & Olmstead（2014）基于 10 个基因片段的研究结果支持心被藤族和丁公藤族形成单系群，为旋花亚科基部类群。此外，菟丝子属的系统发育位置（Stefanović & Olmstead, 2004; McNeal et al., 2007）和鱼黄草族分类地位也尚未明晰（Williams et al., 2014; Simões & Staples, 2017）。

基于基因片段序列（如：*rbcL*，*matK*，*trnL-F* 和 ITS 等）的一些分子系统学研究解决了不同分类阶元的系统发育关系，极大促进了对植物类群间的亲缘关系和演化历史的认识（曾丽萍等, 2014; 张韵洁和李德铢, 2011）。然而，因片段序列所含系统发育信息位点有限且每个基因的进化速率不同，使其构建的系统发育树之间往往存在拓扑结构差异（Rokas et al., 2003; 曾丽萍等., 2014）。因此，为了构建更为可靠的系统发育树，需要整合更多的基因或基因组数据。测序技术的日益成熟，使得越来越多植物基因组得到测序，但因核基因组较大，组装困难，又具有复杂性，使得低拷贝基因筛选困难，这些问题使得在系统发育研究中可用的植物核基因组数据有限。相比较而言，质体基因组因具有存在多拷贝、变异速率适中、高度保守、多数为单亲遗传和不受遗传重组影响等优点，在植物系统发育基因组学研究中被广泛使用（曾丽萍等, 2014; Gitzendanner et al., 2018b; 王伟和刘阳, 2020）。例如，基于 1 827 个质体基因组内的 78 个基因解决了绿色植物主要分支间的系统发育关系（Gitzendanner et al., 2018a），进一步利用 2 881 个质体基因组内的 80 个基因重建被子植物质体基因组系统发育树，全面更新了被子植物系统发育框架（Li et al., 2019）。

本研究收集了广义旋花科主要分支的代表属种，基于质体全基因组数据，意在探讨广义旋花科的范畴并准确构建旋花亚科系统发育框架，以明确菟丝子属系统发育位置和鱼黄草族分类地位的合理性。研究结果将有助于加深对旋花科演化历程的理解，为菟丝子属寄生习性演变和旋花科花色起源与演化的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

根据 Stefanović et al.（2003）重新修订的旋花科系统框架，在族水平上对旋花科进行取样，共收集了旋花科植物 8 个族 21 属 40 个种，代表了旋花亚科内的主要分支，仅缺少茶鹛木亚科的材料。其中 16 属 23 种二代测序数据从中国科学院昆明植物研究所中国西南野生生物种质资源库申请获得，新测序样品的分子材料和凭证标本分别保存在中国西南野生植物种质资源库和中国科学院昆明植物研究所标本馆（KUN）（表 1）。另有 8 属 17 种的质体基因组数据从 GenBank 数据库下载（表 2），并选取茄科烟草（*Nicotiana tabacum*, NC001879）作为外类群。

1.2 质体基因组测序和组装

利用植物基因组 DNA 提取试剂盒[DP320，天根生化科技（北京）有限公司]，从硅胶干燥的新鲜材料或蜡叶标本材料中提取总 DNA，经定量检测后，再进行浅层基因组测序（Genome skimming）（Zeng et al., 2018）。测序文库大小为 350 bp，采用 150 bp 或 250 bp 双端，使用 Illumina MiSeq 或 HiSeq 2500 测序，每个物种获得的测序数据 2 G 左右。测序原始序列利用 GetOrganelle 软件包（Jin et al., 2020）进行 *de novo* 组装，并自动成环输出质体全基因组。无法自动组装成环的物种则采取手动拼接策略，将 scaffolds 文件直接导入 Geneious（Kearse et al., 2012），选取该物种亲缘关系最近且自动成环的序列为参考序列，使用 LASTZ（Harris, 2007）插件进行 contigs 排序和串联，并进行手动校正和拼接。以发表的 *Ipomoea nil*（AP017304）质体全基因组为参考序列，使用 Geneious 对其他旋花科物种进行批量相似性注释，相似性参数设为 70%。随后对注释结果进行手动校正，其中蛋白编码基因的注释依据参考序列和开放阅读框（Open Reading Frame, ORF）确定起始密码子和终止子位置。

1.3 序列比对和系统发育分析

用于矩阵构建的数据集共有五类：（1）质体全基因组序列（WCG，去除一个 IR 区）；（2）大单拷贝（LSC）区；（3）小单拷贝（SSC）区；（4）反向重复（IR）区；（5）蛋白质编码基因（Protein coding sequence, CDS）。以烟草为参考序列，利用 MAUVE（Darling et al., 2004）检测各条序列共线性，非共线性的序列采用手动调整后再次共线性检测。使用 Geneious（Kearse et al., 2012）确定质体基因组四分体结构区域（LSC、SSC、IRa 和 IRb）边界，分别提取各分区序列和蛋白质编码基因片段，得到用于构建数据矩阵的基础序列。WCG、LSC、SSC 和 IR 区数据使用 MAFFT Online（Katoh & Standley, 2013）基于默认参数进行比对，获得比对矩阵。79 个蛋白质基因采用细菌蛋白编码的密码子模式进行比对，每个基因先分别使用 Geneious 中的 MAFFT 插件进行单基因多序列比对，然后再串联构建联合矩阵。自动比对矩阵在 Geneious 中进行人工核查和校对，排除异质性非常高的区域，最终得到五个质体基因组数据矩阵，包括 LSC、SSC 和 IR 三个分区矩阵，蛋白质编码基因联合（CDS）矩阵和质体全基因组（WCG）矩阵，矩阵文件与原始序列均已上传到 figshare 网站（10.6084/m9.figshare.14329949）。采用 MEGA X（Sudhir et al., 2018）统计矩阵的长度、变异位点和简约信号位点等信息。

使用 RAxML 构建最大似然（Maximum likelihood）树（Alexandros, 2014），五个矩阵都选择 GTR+GAMMA+I 模型，估算最优的最大似然树（Best-scoring ML tree），并设置 1 000 次 Bootstrap replicates 估算分支的支持率（Bootstrap support values, BS）。在本研究中，BS≤50

表 1 旋花科新测序物种的凭证信息和质体基因组特征

Table 1 Voucher information and plastome features of newly sequenced within Convolvulaceae

族 Tribe	物种名 Species	凭证标本 Voucher	测序编号 Sequencing code	基因组大小 Plastome size （bp）	LSC 区长度 LSC length （bp）	SSC 区长度 SSC length （bp）	IR 区长度 IR length （bp）	编码基因含量 Protein coding genes	GC 含量 GC content （%）
心被藤族 Cardiochlamyeae	白飞蛾藤 *Dinetus decorus*	蔡杰等, KUN, 15CS11317	S08256	150 529	85 700	13 901	26 815	79	37.8
	毛果飞蛾藤 *D. truncatus*	李永亮等, KUN, YDDXSB107	S03014	148 628	85 092	13 394	29 081	79	37.7
	搭棚藤 *Porana discifera*	张挺等, KUN, 13CS5909	S08786	150 099	84 741	14 464	27 990	79	37.5
	搭棚藤 *Poranopsis discifera*	刘成等, KUN, 13CS6343	S04552	150 536	84 987	14 382	28 081	79	37.7
	大果三翅藤 *Tridynamia sinensis*	张挺等, KUN, 12CS4137	J1596	146 436	86 731	15 116	26 674	79	37.7
旋花族 Convolvuleae	欧旋花 *Calystegia sepium* *	蔡杰等, KUN, 14CS9533	S08092	152 132	88 373	13 970	28 948	79	38.2
	肾叶打碗花 *C. soldanella* *	卞福花, KUN, FH-0201	S01846	152 365	88 433	13 542	28 100	78	37.8
盐帚花族 Cresseae	美丽须帽藤 *Bonamia spectabilis* *	张挺等, KUN, 17CS16107	S09440	135 178	82 905	13 859	28 117	78	37.5
	短梗土丁桂 *Evolvulus nummularius*	蔡杰等, KUN, 15CS10736	S09953	151 345	86 158	10 747	26 705	78	38.1
菟丝子族	金灯藤	董栓录等, KUN,	J5004	120 873	75 280	3 087	26 005	66	38.3

Cuscuteae	*Cuscuta japonica*	TianXH521							
	大花菟丝子 *C. reflexa*	陆露等, KUN, WH-2013-223	S02785	119 875	74 852	13 900	27 586	79	37.8
马蹄金族 Dichondreae	马蹄金 *Dichondra micrantha*	易思荣, KUN, YiSR347	S02993	164 112	86 587	3 344	25 500	66	38.1
丁公藤族 Erycibeae	锈毛丁公藤 *Erycibe expansa*	张挺等, KUN, 09CS1270	S03267	113 273	71 518	14 980	26 589	79	38.9
	锥序丁公藤 *E. subspicata*	亚吉东等, KUN, 14CS9371	J6082	123 094	72 875	11 476	26 751	79	39.5
番薯族 Ipomoeeae	灰毛白鹤藤 Argyreia osyrensis var. cinerea	亚吉东等, KUN, 15CS11494	S07996	162 979	88 626	16 678	27 586	79	40.0
	亮叶银被藤 *A. splendens*	张挺等, KUN, 08CS937	S10321	158 269	84 851	13 673	27 809	79	37.7
	苞叶藤 *Blinkworthia* *convolvuloides*	亚吉东等, KUN, 17CS16596	S09427	161 878	88 273	15 348	27 273	79	40.1
	猪菜藤 *Hewittia malabarica*	蔡杰等, KUN, 13CS7249	S03558	153 016	87 991	11 371	22 409	79	37.2
	毛果薯 *Ipomoea eriocarpa*	蔡杰等, KUN, 15CS11308	S08462	153 621	88 896	13 765	27 252	79	39.0
鱼黄草族 Merremiaeae	海南山猪菜 *Merremia hainanensis*	杨秀森等, KUN, LWX10031	J3942	145 413	83 744	13 590	26 925	79	38.3
	山土瓜 *M. hungaiensis*	王红等, KUN, WH-2012-0696	J5226	154 887	88 860	14 640	28 432	79	37.7
	山猪菜	杨秀森等, KUN,	J1792	152 502	88 178	14 354	27 772	79	37.7

M. umbellata	12CS4918							
地旋花 *Xenostegia tridentata*	张挺等, KUN, 15CS10987	J8001	154 245	88 615	14 521	28 258	79	37.7

注："*"表示该序列为使用 LASTZ 手动拼接成环的样品。

Note："*" represents manually assembling sequence via using LASTZ.为不支持，BS=51~79 为弱或低支持，BS≥80 为强或高支持。

表 2 物种名及 GenBank 登录号

Table 2 Sampled plants and GenBank accession numbers

物种名 Species	GenBank 登录号 GenBank accession number
Cressa cretica	MF067398
田旋花 *Convolvulus arvensis*	MW054627
Ipomoea asarifolia	MK086048
五爪金龙 *I. cairica*	KF242480
I. carnea	MK086049
I. goyazensis	MK086051
心叶茑萝 *I. hederifolia*	KF242484
牵牛 *I. nil*	AP017304
小心叶薯 *I. obscura*	KF242499
I. pedicellaris.	KF242489
刺毛月光花 *I. setosa*	KF242492
I. trifida	MH173262
Merremia quinquefolia	KF242501
Operculina macrocarpa	KF242502
Stictocardia macalusoi	KF242503
Turbina corymbosa	KF242504
Cuscuta exaltata	EU189132

选取 WCG 和 CDS 矩阵构建贝叶斯（Bayesian inference）树。基于 PhyloSuite （Zhang et al., 2020）软件中的 ModelFinder 插件（Kalyaanamoorthy et al., 2017）按照 BIC 准则（Bayesian information criterion，BIC）选择最适碱基替换模型。选择 MrBayes 软件（Huelsenbeck & Ronquist, 2001），通过在线 CIPRES Science Gateway （Miller et al., 2010） 或超级计算机上进行贝叶斯推论分析，设置 MCMC 运算 2 000 000 代，每 100 代取样 1 棵系统发育树。舍弃前 25%的抽样树，再构建 50%的多数原则一致树（Majority rule consensus of trees），并计算每个节点的后验概率（Posterior Probability, PP）。最后获得的系统发育树均采用 Figtree v1.4.0 （http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/）可视化结果。在本研究中，PP=0.51~0.94 为弱或低支持，PP≥0.95 为强或高支持。

1.4 系统发育冲突检测

采用 AU 检验（Approximately unbiased test）（Shimodaira, 2002）和 SH 检验（Shimodaira-Hasegawa test）（Hidetoshi & Masami, 1999），以判断 WCG 数据集得到的最优树与其他数据集得到的最优树（包括 LSC 区的 ML 树、IR 区的 ML 树和 SSC 区的 ML 树）是否有统计学的差异。SH 检验基于非参数自举法的比较方法，在拒绝零假设方面十分保守，和 AU 检测一样能够有效控制 I 型错误，但 AU 检测比 SH 检测的偏差小。两种系统发育假设检验借助 IQ-TREE 软件（Trifinopoulos et al., 2016），通过最大似然方法，使用 RELL 算法进行 1 000 次重复取样，任何一种结果的 P 值小于 0.05，即为显著，表明该拓扑结构与 WCG 矩阵结果为明显冲突，不支持此拓扑结构。

2 结果与分析

2.1 质体基因组特征

旋花科新测序物种均为典型的四分体结构，由一个大单拷贝区（LSC）、小单拷贝区（SSC）和两个反向重复序列（IR）组成。质体基因组大小为 113 273~164 112 bp，LSC 区大小为 71 518~88 896 bp，SSC 区大小为 3 087~16 678 bp，IR 区大小为 22 409~29 081 bp，且 GC 含量变化范围为 37.2%~40.1%（表 1）。基因注释结果显示，除菟丝子属外，旋花科自养类群的蛋白质编码基因含量保守，数目为 78~79 个。菟丝子属因其独特的寄生习性导致部分基因丢失，仅含 66 个蛋白质编码基因。

2.2 矩阵数据特征

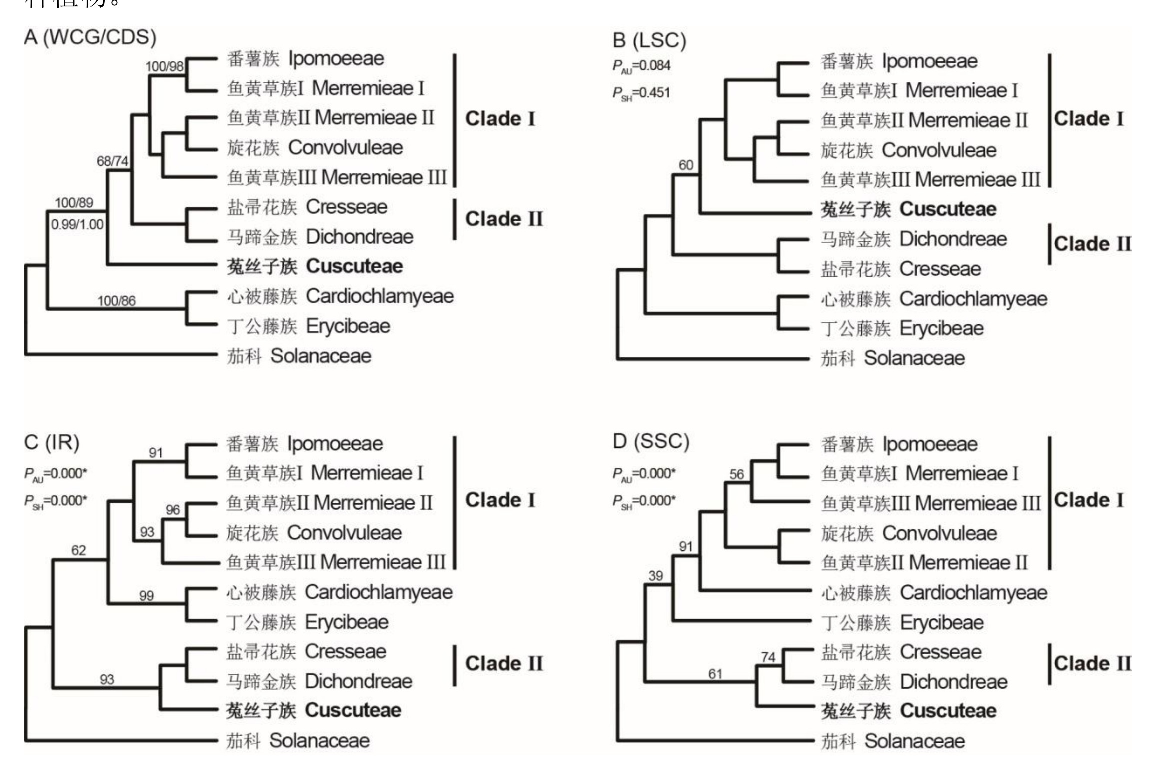
在五种质体基因组比对矩阵中，WCG 矩阵长 166 691 bp，具有 53 093 个变异位点（占序列长度的 31.9%）和 28 675 个简约信号位点（占序列长度的 17.2%），序列多样性最高；CDS 区矩阵长 76 883 bp，具有 21 748 个变异位点和 12 292 个简约信号位点，分别占 WCG 矩阵变异位点和简约信号位点的 41.0%和 42.9%；IR 区矩阵长 37 107 bp，具有 9 908 个变异位点和 5 574 个简约信号位点；SSC 区矩阵长 8 232 bp，具有 3 596 个变异位点和 1 966 个简约信号位点；LSC 联合矩阵长 112 926 bp，具 37 053 个变异位点和 19 699 个简约信号位点。

2.3 系统发育分析

在广义旋花科内（包含菟丝子属和马蹄金族），除鱼黄草族（鱼黄草属）外，其他 7 个族在所有分析中均形成单系（图 1，图 2）。同时，盐帚花族和马蹄金族互为姊妹群，番薯族和鱼黄草族内的 *Merremia quinquefolia* 互为姊妹群，旋花族和部分鱼黄草族物种互为姊妹群，所有分析均强支持这 3 个分支形成单系群。

基于 WCG 和 CDS 联合矩阵，ML 和 BI 分析得到拓扑基本一致的系统树（图 1），仅基于 CDS 矩阵的 BI 树与 ML 树存在一个小分支冲突，即大果三翅藤（*Tridynamia sinensis*）在心被藤族内的系统位置关系。另外，CDS 矩阵结果在少数分支上的支持率比 WCG 矩阵要略低（图 1）。在总体上，心被藤族与丁公藤族具有较近亲缘关系在四矩阵分析中都得到了强烈支持（BS≥86，PP=1.00），二者形成一个分支最早分化出来，是其他广义旋花科姊妹群在

WCG 矩阵、CDS 矩阵和 LSC 矩阵分析得到了支持（WCG-/CDS-/LSC-BS=100/89/100; WCG-/CDS-PP=0.99/1.00），而 IR 矩阵显示它们与鱼黄草族等三族（Clade I）可能是姐妹关系（BS=62）（图 1）。在 WCG 矩阵和 CDS 矩阵，菟丝子族形成一个孤立的单系分支与其余所有旋花科物种形成姊妹关系（WCG-/CDS-BS=68/74; WCG-/CDS-PP=1.00/1.00），剩下的 5 个族分为两个分支在所有的分析中都得到了强烈支持，即旋花族、鱼黄草族和番薯族组成 Clade I，盐帚花族和马蹄金族组成 Clade II。在 Clade I 中，旋花族和番薯族各自形成单系群，嵌套在鱼黄草族中，且 LSC 矩阵分析时和菟丝子族聚在一起（BS=60）。但是 IR 矩阵（BS=93）和 SSC 矩阵（BS=61）支持菟丝子族与盐帚花族+马蹄金族为姐妹类群。值得关注的是鱼黄草属 4 个种分散在 3 个不同的分支上，即海南山猪菜（*Merremia hainanensis*）与旋花族聚在一起（BS≥96，PP=1.00），五叶鱼黄藤（*Merremia quinquefolia*）与番薯族聚在一起（BS≥98，PP=1.00），剩下两种和其他三种鱼黄草族的属种一起（BS=100，PP=1.00）。番薯属是一个并系类群，所有分析都形成了两个分支（BS=100，PP=1.00），其中一支包括了另 4 属 5 种植物。

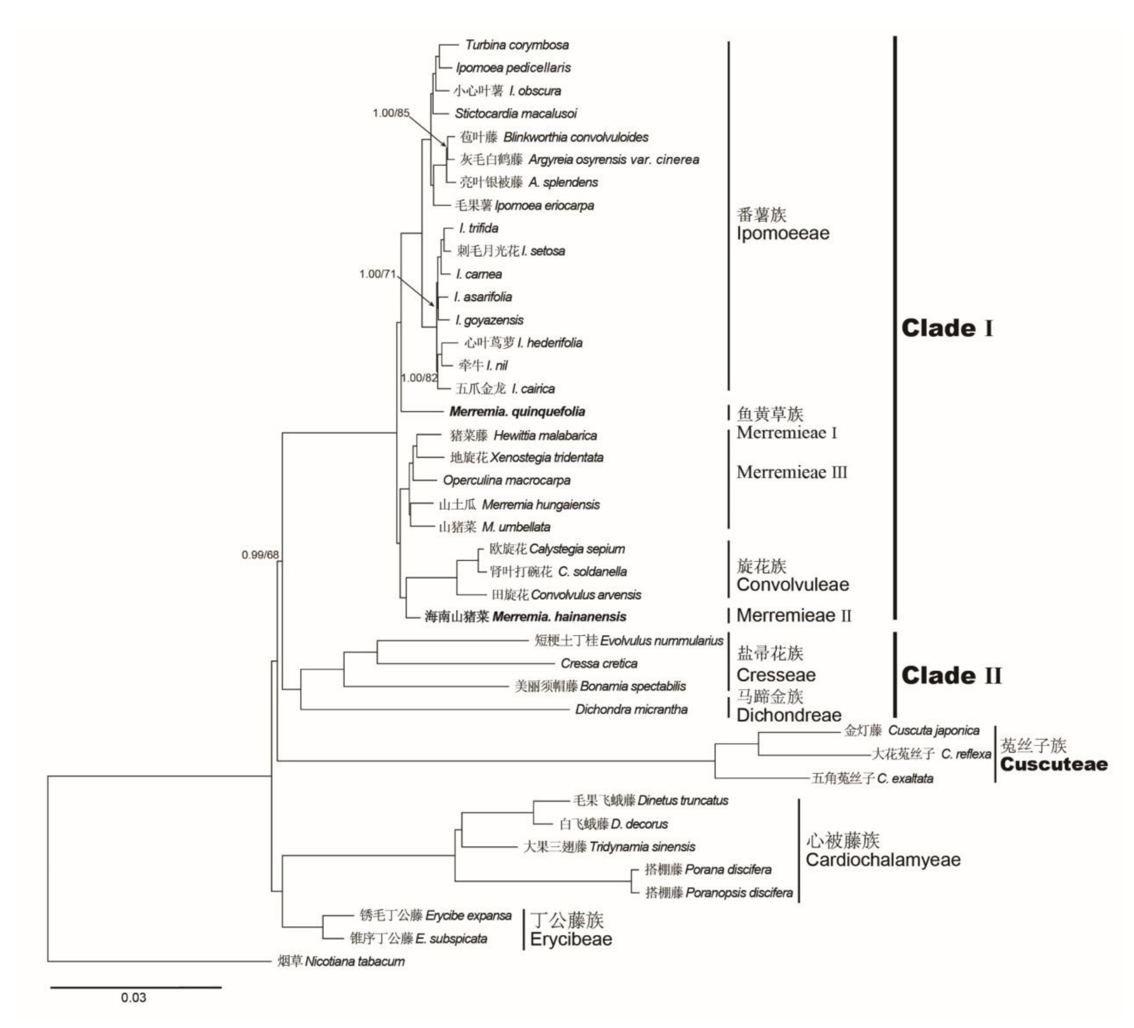


枝上数值表示 bootstrap 值，支持率为 100 的分支不标注。图 A 中，枝上的数值表示 bootstrap 值（BS_{WCG}/BS_{CDS}），枝下的数值表示贝叶斯后验概率（PP_{WCG}/PP_{CDS}），BS_{WCG}/BS_{CDS}=100/100 和 PP_{WCG}/PP_{CDS}=1.00/1.00 的分支不标注。

Numbers above branches indicate bootstrap value and branches with 100 bootstrap support are unlabeled. In A, numbers above and below branch labels represent bootstrap （BS_{WCG}/BS_{CDS}） and posterior probability （PP_{WCG}/PP_{CDS}）, branches with BS_{WCG}/BS_{CDS}=100/100 or PP_{WCG}/PP_{CDS}=1.00/1.00 support are unlabeled.

图 1 基于不同的质体基因组矩阵构建的旋花科的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of Convolvulaceae based on different data matrixes of plastome



枝上数值以 BI_{pp}/ML_{BS} 的方式表示后验概率值/自展支持率值，支持率为 1.00/100 的分支不标注。比例尺表示最大似然法分析下每个位点的核苷酸替代速率。

Branch labels represent bootstrap follow the order BI_{pp}/ML_{BS} and branches with 1.00/100 support are unlabeled. Scales bars denotes the excepted number of substitutions per site in maximum likelihood analysis.

图 2 基于 WCG 矩阵构建的旋花科系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of Convolvulaceae based on WCG matrix

2.4 系统发生冲突检测

WCG 矩阵和 CDS 矩阵与其他 3 个矩阵构建的系统树存在明显的拓扑结构差异，因此利用 AU 检验和 SH 检验进行冲突显著性评估（表 3）。检测结果表明 WCG 矩阵与 LSC 矩阵的拓扑结构不存在明显的拓扑结构冲突，即菟丝子族与 Clade I 构成姐妹关系是存在可能（P_{AU}=0.0837; P_{SH}=0.451），但拒绝 IR 和 SSC 区的拓扑结构关系（P 值均小于 0.001）（表 3）。

表 3 AU 检验和 SH 检验的结果

Table 3 Results of AU and SH test

拓扑结构约束 Topological constraint	最大似然估计值 -LnL	deltaL	近似无偏检验 AU test	Shimodaira-Hasegawa 检验 SH test
WCG 拓扑结构 WCG topology	721494.39	-	-	-
LSC 拓扑结构 LSC topology	721516.48	37.24	0.08	0.45

SSC 拓扑结构 SSC topology	723779.52	339.44	0.00	0.00
IR 拓扑结构 IR topology	726774.28	512.99	0.00	0.00

3 讨论与结论

3.1 广义旋花科的界定

传统分类上，由于研究者们对性状加权不同，使得旋花科的界定混乱，特别是菟丝子属和马蹄金族（Austin, 1973）。多数学者主张将寄生习性的菟丝子属处理为旋花科内单属族（Choisy, 1834; Bentham & Hooker, 1873; Peter, 1897; Austin, 1998）或者亚科（Peter, 1891），也有少数主张将菟丝子属处理为单属科（Austin, 1973; Lindley, 1853; Roberty, 1952, 1964）。另外，也有学者将马蹄金族作为独立的科（Dumortier, 1829; Austin, 1973; Stefanović et al., 2003）。本研究的质体基因组系统发育分析结果表明，现在划定的旋花科是一个“自然”类群，即菟丝子属与马蹄金族均应包括在旋花科内，不应独立成科，这与 Stefanović et al.（2002）基于 4 个质体基因组片段系统发育结果一致。同时，该结果也支持 Stefanović et al.（2003）对旋花科的科下等级划分，即菟丝子科并入旋花科内为菟丝子族，与马蹄金族一起被置于旋花亚科内。

3.2 旋花亚科的系统发育关系

现有的分子系统学研究已构建了旋花科的 2 亚科 12 族的系统框架，但是旋花亚科内主要分支的系统发育关系尚未厘清，特别是心被藤族、丁公藤族和菟丝子族的系统位置（李攀, 2020）。Stefanović et al.（2002）基于 4 个质体基因数据推断丁公藤族和心被藤族各为一个分支，依次位于其他旋花亚科的基部。随后增加线粒体基因 *atpA*、核基因 RPB2 和质体基因 *rpl2* 后，心被藤族、丁公藤族和旋花亚科其他族形成“梳齿”关系（Stefanović & Olmstead, 2004），无法确定系统位置。Refulio-Rodriguez & Olmstead（2014）联合 9 个质体基因和 1 个线粒体基因序列的分析结果较弱地支持心被藤族和丁公藤族聚为一支，位于旋花亚科基部。由于该研究旋花科取样较少，这两个族各仅有一种，支持率较低，且缺少菟丝子族、盐帚花族等 6 族的代表，所以二者的亲缘关系和系统位置没有完全澄清。本研究中的四组数据矩阵（除 IR 矩阵外）分析结果均强烈支持心被藤族和丁公藤族为姐妹关系，且可能是最早从旋花亚科内分化出来（图 1）。由于 IR 和 SSC 区矩阵的 ML 树在这些分支的支持率较弱，AU 检验和 SH 检验均显示两种拓扑结构与 WCG 矩阵的拓扑结构存在明显冲突，这可能是 IR 和 SSC 区基因的核苷酸替换速率不一致所造成的（Zhu et al., 2016）。

针对菟丝子族在旋花科内的系统位置，本研究结果显示，WCG 矩阵和 CDS 矩阵强烈支持 Clade I 和 Clade II 互为姊妹关系，然后与菟丝子族聚在一起。此结果明显优于之前基于基因片段的研究。譬如，Stefanović & Olmstead（2004）基于多基因片段分析结果显示菟丝子族、Clade I 和 Clade II 聚在一起形成“梳齿”结构。随后，McNeal et al.（2007）使用 ML 和 BI 法基于质体和核基因片段联合矩阵的结果支持 Clade I 是菟丝子族的姊妹群，但该结果仅得到 *rps2* 基因矩阵支持。不过值得注意的是，McNeal et al.（2007）研究中，*rbcL* 基因矩阵的结果与本研究的 LSC 矩阵均支持 Clade II 和菟丝族可能为姊妹类群，且拓扑结构冲突检测的结果也无法拒绝此拓扑结构。因此，以上这些关系的冲突不仅揭示取样不同的分子数据对菟丝子属系统位置的影响，也表明若想进一步探讨菟丝子族系统位置，核基因组数据不可或缺。

3.3 鱼黄草族的多系性

鱼黄草族的多系性在以往的研究中多有报道（Stefanović et al., 2003; Stefanović & Olmstead, 2004），尤其是其中的鱼黄草属（Simões et al., 2015）。依据单系性的标准，传统概

念的鱼黄草族得到一定修订，被移出的属种多归入到白衫藤族，但番薯族仍嵌套在广义鱼黄草族内。此外还有一些鱼黄草属的种分散在鱼黄草族外，因此重新修订过的鱼黄草族仍非单系（Stefanović et al., 2003）。Stefanović & Olmstead（2004）采用 10 个单基因片段联合矩阵结果再次显示，番薯族嵌套在广义鱼黄草族中，它们与旋花族共同构成的分支再与白衫藤族构成姊妹群关系。Simões et al.（2015）进行广泛取样，基于核糖体 ITS 和叶绿体 *matK*、*rps16* 和 *trnL-F* 基因联合矩阵分析表明鱼黄草族确非单系，尤其是鱼黄草属分成了 10 个分支，且番薯族仍嵌套在广义鱼黄草族中。因此，Simões & Staples（2017）提议废弃鱼黄草族的划分，改用分支的概念，并把一些鱼黄草属的种划入其他属或建立新属，但这些处理还需更多证据的支持。我们基于质体基因组系统发育分析结果显示，旋花族和番薯族分别形成单系群，位于 Clade II 中，但是鱼黄草族分成了 3 个分支，其中海南山猪菜和五叶鱼黄藤分别与旋花族和番薯族聚在一起。质体系统发育基因组分析结果与 Simões et al.（2015）的研究结果有一些出入，考虑到可能是取样偏差、基因数据量差异大、地区特有种等原因造成系统发育推断的分歧。同时，Simões et al.（2015）的系统树主干分支支持率很低，分支之间的关系存在很多不确定性。因此，对于鱼黄草属的重新修订还需要更深入的研究，特别是特有种的收集和新的基因组数据的使用。

致谢：感谢中国西南野生生物种质资源库大科学工程项目对本研究的支持并提供旋花科的分子材料，感谢中国科学院西双版纳热带植物园公共技术服务中心超算平台的支持。

参考文献：

ALEXANDROS S, 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies [J]. Bioinformatics, 30(9): 1312-1313.

AUSTIN DF, 1973. The American Erycibeae (Convolvulaceae): *Maripa*, *Dicranostyles*, and *Lysiostyles* I. Systematics [J]. Ann Mo Bot Gard, 60(2): 306-412.

AUSTIN DF, 1998. Biodiversity & taxonomy of tropical flowering plants [M]. Calicut: Mentor Books: 201-234.

BAILLON H, 1891. Histoire des plantes [M]. Paris: Li Brairie Hachett and Cie: 305-331.

BENTHAM G, HOOKE JD, 1873. Genera plantarum [M]. London: Lovell Reeve & Co: 865-881.

BRUMMIT RK, STAPLES GW, 2007. Flowering plant families of the world [M]. Kew: Royal Botanic Gardens.

CHOISY JD, 1834. Convolvulaceae orientalis [J]. Mem Soc Phys Hist Nat Geneve, 6: 383-502.

COSTEA M, STEFANOVIĆ S, 2009. *Cuscuta jepsonii* (Convolvulaceae): An invasive weed or an extinct endemic? [J]. Amer J Bot, 96(9): 1744-1750.

DARLING AC, MAU B, BLATTNER FR, et al., 2004. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements [J]. Genome Res, 14(7): 1394-1403.

DUMORTIER B, 1829. Analyse des plantes [M]. Paris: Tournay.

GITZENDANNER MA, SOLTIS PS, WONG GK, et al., 2018a. Plastid phylogenomic analysis of green plants: A billion years of evolutionary history [J]. Amer J Bot, 105(3): 291-301.

GITZENDANNER MA, SOLTIS PS, YI T-S, et al., 2018b. Plastome phylogenetics: 30 years of inferences into plant evolution [J]. Advan Botan Res, 85: 293-313.

HARRIS RS, 2007. Improved pairwise alignmnet of genomic DNA [D]. Pennsylvania: The Pennsylvania State University: 74.

HIDETOSHI S, MASAMI H, 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference [J]. Mol Biol Evol, 16(8): 1114-1116.

HUELSENBECK PJ, RONQUIST F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. Bioinformatics, 17(8): 754-755.

JIN JJ, YU WB, YANG JB, et al., 2020. GetOrganelle: A fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes [J]. Genome Biol, 21(1): 241.

KALYAANAMOORTHY S, MINH BQ, WONG TKF, et al., 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates [J]. Nat Methods, 14(6): 587-589.

KATOH K, STANDLEY DM, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability [J]. Mol Biol Evol, 30(4): 772-780.

KEARSE M, MOIR R, WILSON A, et al., 2012. Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data [J]. Bioinformatics, 28(12): 1647-1649.

LI HT, YI TS, GAO LM, et al., 2019. Origin of angiosperms and the puzzle of the Jurassic gap [J]. Nat Plants, 5(5): 461-470.

LI P, 2020. The families and genera of Chinese vascular plants (Vol. III) [M]. Beijing: Science Press: 1869-1883. [李攀, 2020. 中国维管植物科属志（下卷）[M]. 北京：科学出版社：1869-1883.]

LINDLEY J, 1853. The vegetable kingdom; or, the structure, classification, and uses of plants [M]. London: Bradbury & Evans.

MCNEAL JR, ARUMUGUNATHAN K, KUEHL JV, et al., 2007. Systematics and plastid genome evolution of the cryptically photosynthetic parasitic plant genus *Cuscuta* (Convolvulaceae) [J]. BMC Biol, 5: 55.

MILLER MA, PFEIFFER W, SCHWARTZ T, 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees [J]. IEEE Comput Soc Bioinf Conf: 1-8.

PETER A, 1891. Die natürlichen pflanzenfamilien (Teil 4) [M] Leipzig: W. Engelmann: 1-40.

PETER A, 1897. Die natürlichen pflanzenfamilien (Teil 4) [M] Leipzig: W. Engelmann: 375–377.

PICHON M, 1947. Le genre Humbertia [J]. Not Syst, 13: 13–25.

REFULIO-RODRIGUEZ NF, OLMSTEAD RG, 2014. Phylogeny of Lamiidae [J]. Amer J Bot, 101(2): 287-299.

ROBERTY G, 1952. Genera Convolvulacearum [J]. Candollea, 14: 11-65.

ROBERTY G, 1964. Les genres des Convolvulace´es (esquisse) [J]. Boissiera, 10: 129–156.

ROKAS A, WILLIAMS BL, KING N, et al., 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies [J]. Nature, 425(6960): 798-804.

SHIMODAIRA H, 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection [J]. Syst Biol, 51(3): 492-508.

SIMõES AR, CULHAM A, CARINE M, 2015. Resolving the unresolved tribe: A molecular phylogenetic framework for the Merremieae (Convolvulaceae) [J]. Bot J Linn Soc, 179(3): 374–387.

SIMõES AR, STAPLES G, 2017. Dissolution of Convolvulaceae tribe Merremieae and a new classification of the constituent genera [J]. Bot J Linn Soc, 183(4): 561–586.

STEFANOVIĆ S, AUSTIN D, OLMSTEAD R, 2003. Classification of Convolvulaceae: A phylogenetic approach [J]. Syst Bot, 28(4): 791–806.

STEFANOVIĆ S, KRUEGER L, OLMSTEAD RG, 2002. Monophyly of the Convolvulaceae and circumscription of their major lineages based on DNA sequences of multiple chloroplast loci [J]. Amer J Bot, 89(9): 1510-1522.

STEFANOVIĆ S, OLMSTEAD RG, 2004. Testing the phylogenetic position of a parasitic plant (*Cuscuta*, Convolvulaceae, asteridae): Bayesian inference and the parametric bootstrap on data drawn from three genomes [J]. Syst Biol, 53(3): 384-399.

SUDHIR K, GLEN S, MICHAEL L, et al., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Mol Biol Evol, 35(6): 1547-1549.

TRIFINOPOULOS J, NGUYEN LT, VON HAESELER A, et al., 2016. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis [J]. Nucl Acid Res, 44(W1): W232-W235.

WANG W, LIU Y, 2020. The current status, problems, and policy suggestions for reconstructing the plant tree of life [J]. Biodivers Sci, 28(2): 176-188. [王伟，刘阳, 2020. 植物生命之树重建的现状、问题和对策建议 [J]. 生物多样性, 28（2）: 176-188.]

WILLIAMS BRM, MITCHELL TC, WOOD J, et al., 2014. Integrating DNA barcode data in a monographic study of *Convolvulus* [J]. Taxon, 63(6): 1287-1306.

ZENG CX, HOLLINGSWORTH PM, YANG J, et al., 2018. Genome skimming herbarium specimens for DNA barcoding and phylogenomics [J]. Plant Methods, 14(1): 43.

ZENG LP, ZHANG N, MA H, 2014. Advances and challenges in resolving the angiosperm phylogeny [J]. Biodivers Sci, 22(1). [曾丽萍，张宁，马红, 2014. 被子植物系统发育深层关系研究: 进展与挑战 [J]. 生物多样性, 22(1).]

ZHANG D, GAO F, JAKOVLIC I, et al., 2020. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. Mol Ecol Resour, 20(1): 348-355.

ZHANG YJ, LI DZ, 2011. Advances in phylogenomics based on complete chloroplast genomes [J]. Plant Divers Resour, 4(33): 365-375. [张韵洁，李德铢, 2011. 叶绿体系统发育基因组学的研究进展 [J]. 植物分类与资源学报, 4(33): 365-375.]

ZHU A, GUO W, GUPTA S, et al., 2016. Evolutionary dynamics of the plastid inverted repeat: the effects of expansion, contraction, and loss on substitution rates [J]. New Phytol, 209(4): 1747-1756.